

NEW PROTEIN AND DNA THEREFOR

Patent number: JP10099084
 Publication date: 1998-04-21
 Inventor: YOSHIMURA KOJI; HIKICHI YUICHI
 Applicant: TAKEDA CHEM IND LTD
 Classification:
 International: C12N15/09; A61K38/46; A61K48/00; A61K48/00; A61K48/00;
 A61K48/00; A61K48/00; A61K48/00; A61K48/00; A61K48/00;
 A61K48/00; A61K48/00; A61K48/00; A61K48/00; A61K48/00;
 A61K48/00; C07H21/04; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/50;
 C12P21/08; G01N33/53; G01N33/577

European:
 Application number: JP19970106510 19970424
 Priority number(s):

Report a data error here

Abstract of JP10099084

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new protein having a specific amino acid sequence, having cysteine protease activity, and useful as a preventive/therapeutic agent for diseases such as diabetic nephropathy, glomerular nephritis, hepatic fibrosis, pulmonary fibrosis, hernia of the intervertebral disk and sciatica.

SOLUTION: This new protein (salt) has an amino acid sequence of the formula or amino acid sequence essentially identical with the former, having cysteine protease activity. This protein or the DNA coding it is useful as a medicine such as a preventive/therapeutic agent for various diseases (e.g. nephropathy such as diabetic nephropathy and glomerular nephritis, hepatopathy such as hepatic fibrosis, pulmonary fibrosis, hernia of the intervertebral disk, sciatica, livor cutis). This new protein is obtained by the following process: a cDNA library derived from human spleen is subjected to hybridization with a probe prepared by biotinylation of synthesized oligonucleotide followed by labeling, and by integrating a vector with the resultant cysteine protease gene followed by expressing the gene in host cell.

Met Val Cys Arg Leu Pro Val Ser Lys Lys Thr Leu Ile Cys Ser Phe
 1 5 10 15
 Glu Val Leu Asp Glu Leu Gly Arg His Val Leu Leu Arg Lys Asp Cys
 20 25 30
 Gly Pro Val Asp Thr Lys Val Pro Gly Ala Gly Glu Pro Lys Ser Ala
 35 40 45
 Pro Phe Trp Ala Ile Lys Asn Ser Trp Gly Thr Asp Ile Gly Glu Lys
 355 360 365
 Gly Tyr Tyr Tyr Leu His Arg Gly Ser Gly Ala Cys Gly Val Asp Thr
 370 375 380
 Met Ala Ser Ser Ala Val Val Asp
 385 390

Data supplied from the esp@cenet database - Patent Abstracts of Japan

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-99084

(43)公開日 平成10年(1998)4月21日

(51) Int.Cl. [®]	識別記号	F I
C 12 N 15/09	Z NA	C 12 N 15/00
A 61 K 38/46		A 61 K 48/00
48/00	AAH	AAH
	AAM	AAM
	ABG	ABG
		ABJ

審査請求 未請求 請求項の数16 O L (全 26 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平9-106510

(22)出願日 平成9年(1997)4月24日

(31)優先権主張番号 特願平8-104901

(32)優先日 平8(1996)4月25日

(33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72)発明者 吉村 浩二

茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田

春日ハイツ101号

(72)発明者 引地 裕一

茨城県つくば市松代四丁目21番2 シャレ

ールつくば松代1号棟504

(74)代理人 弁理士 朝日奈 忠夫 (外1名)

(54)【発明の名称】 新規タンパク質およびそのDNA

(57)【要約】 (修正有)

【課題】新規システィンプロテアーゼの提供。
 【解決手段】新規システィンプロテアーゼもしくはその部分ペプチド、該タンパク質をコードするDNA、該DNAを含有する組換えベクター、形質転換体、該タンパク質の製造法、該タンパク質もしくはDNA含有してなる医薬、該タンパク質に対する抗体、該タンパク質のプロテアーゼ活性を促進もしくは阻害する化合物のスクリーニング方法、スクリーニング用キットおよびスクリーニングで得られる化合物またはその塩。

【効果】タンパク質またはそれをコードするDNAは、例えば、糖尿病性腎症、子球体腎炎などの腎疾患、肝繊維症などの肝疾患、肺纖維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛、大理石病などの種々の疾病的治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその塩。

【請求項2】システインプロテアーゼ活性を有する請求項1記載のタンパク質。

【請求項3】請求項1記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。

【請求項4】請求項1記載のタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。

【請求項5】配列番号：3で表わされる塩基配列を有する請求項4記載のDNA。

【請求項6】請求項4記載のDNAを含有する組換えベクター。

【請求項7】請求項6記載の組換えベクターを保持する形質転換体。

【請求項8】請求項7記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のタンパク質を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項1記載のタンパク質またはその塩の製造方法。

【請求項9】請求項1記載のタンパク質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有してなる医薬。

【請求項10】糖尿病性腎症、子球体腎炎、肝纖維症、肺纖維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛または大理石病の治療・予防剤である請求項9記載の医薬。

【請求項11】請求項4記載のDNAを含有してなる医薬。

【請求項12】糖尿病性腎症、子球体腎炎、肝纖維症、肺纖維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛または大理石病の治療・予防剤である請求項11記載の医薬。

【請求項13】請求項1記載のタンパク質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体。

【請求項14】請求項1記載のタンパク質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする請求項1記載のタンパク質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法。

【請求項15】請求項1記載のタンパク質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有してなる請求項1記載のタンパク質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング用キット。

【請求項16】請求項14記載のスクリーニング方法または請求項15記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求項1記載のタンパク質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物またはその塩。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規なシステインプロテアーゼおよびそのDNAに関する。

【0002】

【従来の技術】リソゾームは多数の加水分解酵素を含む細胞内小器官であり、リソゾームのプロテアーゼ群は協同的に働くことにより、細胞内・外より取り込まれたタンパク質を分解する。これには、リソゾーム内のパパインファミリーに属するシステインプロテアーゼ群が主役を演じていることが分かっている。また、これらの酵素の一部は細胞外に活性を有しない前駆体の形で分泌され、活性化を受けた後にタンパク質の分解に関与する。パパインファミリーに属するシステインプロテアーゼは哺乳動物、植物、寄生虫、原虫、昆虫ウイルス等に広く分布しており、マンソン住血吸虫のカテプシンL様システインプロテアーゼはヘモグロビンの分解に関与することが示唆されている（A. M. Smithら、モレキュラー・アンド・バイオケミカルパラサイトロジー、67巻、11-19頁、1994年）。ヒトでは、パパインファミリーに属するシステインプロテアーゼはカテプシンB、H、LおよびSのアイソザイムが古くから知られている。これらの酵素は、活性に関与するシステイン、ヒスチジンおよびアスパラギン酸およびこれらのアミノ酸の周辺のcatalytic domainのアミノ酸配列は非常によく保存されているが、異なった酵素特性を示すことが知られている。例えば、カテプシンHやBはエンドペプチダーゼ活性は弱く、アミノペプチダーゼまたはカルボキシルペプチダーゼ活性が顕著である。一方、カテプシンLおよびSは強いエンドペプチダーゼ活性を示す。最近、破骨細胞に発現が顕著なカテプシンO（OC2）が報告され、新規のアイソザイムが存在する可能性が示唆されている。

【0003】カテプシンB、H、L（S. Ga1ら、バイオケミカルジャーナル、253巻、303-306頁、1988年）およびSのシステインプロテアーゼはプロ酵素の活性化、酵素の不活性化、抗原提示、ホルモン成熟化、骨吸収および組織の再構成等様々な生理活性を有することが知られている。特に、組織の再構成におけるシステインプロテアーゼの持つ蛋白分解活性は非常に重要である。これらの酵素自身がコラーゲンやプロテオグリカンなどの細胞外マトリックスの分解酵素として働くだけでなく、他の細胞外マトリックス分解酵素であるセリンプロテアーゼ群やマトリックス金属プロテアーゼ群の活性化を引き起こすことが知られている。また、システインプロテアーゼは、慢性関節リウマチ、変形性関節炎などの関節炎、骨粗鬆症、腫瘍転移・浸潤、肺気腫、アルツハイマー病等の神経変性疾患、筋ジストロフィー症などの筋消耗性疾患等の種々の疾病との関連が明らかにされている。従つて、これらの酵素の活性を調節する、阻害剤または促進剤は上記の疾病的治療薬として用いられ得る。一方、欧洲では、パパインファミリーに属するキモパパインが椎

間板ヘルニアの治療に古くから用いられている。しかし、アナフィラキシーを引き起こすことがあり、適応できる患者は限定され、ヒト由来の抗原性のないプロテアーゼが望まれている。

【0004】cDNAライブラリーからランダムに選んだcDNAクローンの部分配列 (expressed sequence tags, ESTsと略される) を決定することにより、その臓器や細胞における遺伝子発現のレベルや新規遺伝子を見いだす試みが報告されている。M. D. Adamsらは脳のcDNAライブラリーから得たESTsを多数報告している(ネイチャージェネティクス、4巻、373-380頁、1993年)。これらのESTsの一つであるEST06771 (GenBankアクセッション番号T08879) は、ESTのデータベースであるdbESTにおいて、大豆等の植物やトリパノソーマ等のシスティンプロテアーゼと類似していることが記載されている。しかし、ESTsの配列は正確性に欠け、かつ一部分の塩基配列であることから、データベースに登録されているESTsの塩基配列と同一の遺伝子が実際に存在し、かつ生体内で機能しているかどうかは明らかではなかった。

【0005】

【本発明が解決しようとする課題】新たなヒト由来のシスティンプロテアーゼは、システィンプロテアーゼに対して阻害活性あるいは促進活性を発揮し、システィンプロテアーゼに基づく種々の疾患、例えば、関節炎、神経変成疾患、筋消耗性疾患等の予防や治療に役立つ新たな医薬品の開発を可能にする。したがって、本発明の分野では、ヒト由来の新規システィンプロテアーゼを見いだし、大量に産生する方法の開発が望まれていた。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題を解決するために銳意研究を重ねた結果、ヒト脾臓由来cDNAライブラリーから、新規な塩基配列を有するcDNAをクローニングすることに成功し、それにコードされるタンパク質がシスティンプロテアーゼであることを見いだした。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0007】すなわち、本発明は、(1)配列番号:1で表わされるアミノ酸配列またはそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその塩、(2)システィンプロテアーゼ活性を有する第(1)項記載のタンパク質、(3)第(1)項記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、(4)第(1)項記載のタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、(5)配列番号:3で表される塩基配列を有する第(4)項記載のDNA、(6)第(4)項記載のDNAを含有する組換えベクター、(7)第(6)項記載の組換えベクターを保持する形質転換体、(8)第(7)項記載の形質転換体を培養し、第(1)項記載のタンパ

ク質を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする第(1)項記載のタンパク質またはその塩の製造方法、(9)第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有してなる医薬、(10)糖尿病性腎症、子球体腎炎、肝纖維症、肺纖維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛または大理石病の治療・予防剤である第(9)項記載の医薬。

【0008】(11)第(4)項記載のDNAを含有してなる医薬、(12)糖尿病性腎症、子球体腎炎、肝纖維症、肺纖維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛または大理石病の治療・予防剤である第(11)項記載の医薬、(13)第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体、(14)第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法、(15)第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有してなる第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング用キット、および(16)第(14)項記載のスクリーニング方法または第(15)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物またはその塩を提供する。

【0009】さらに、本発明は、(17)配列番号:2で表わされるアミノ酸配列を有する第(3)項記載の部分ペプチド、(18)配列番号:3で表わされる塩基配列とハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、(19)第(18)項記載のDNAを含有する組換えベクター、(20)第(19)項記載の組換えベクターを保持する形質転換体、(21)第(20)項記載の形質転換体を培養し、タンパク質を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするタンパク質またはその塩の製造方法、(22)第(21)項記載の製造法で製造されるタンパク質またはその塩、(23)第(14)項記載のスクリーニング方法または第(15)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる医薬、(24)糖尿病性腎症、子球体腎炎、肝纖維症、肺纖維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛または大理石病の治療・予防剤である第(23)項記載の医薬、(25)第(14)項記載のスクリーニング方法または第(15)項記載のスクリーニ

ング用キットを用いて得られる、第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、(26)慢性関節リウマチ、変形性関節炎、骨粗鬆症、腫瘍転移・浸潤、肺気腫、アルツハイマー病、筋ジストロフィー症、角膜疾患、水疱泡症、歯周病、天疱瘡、早産または分娩遅延の治療・予防剤である第(25)項記載の医薬、(27)第(13)項記載の抗体と、被検液および標識化された第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の定量法、および(28)被検液と担体上に不溶化した第(13)項記載の抗体および標識化された第(13)項記載の抗体とを同時に連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の定量法を提供する。

【0010】本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質（以下、本発明のタンパク質と称する）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、臍臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、纖維芽細胞、纖維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）またはこれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髓、小脳）、脊髄、下垂体、胃、臍臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、頸下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巢、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同意を有するアミノ酸配列などが挙げられ、特に、タンパク質の構成アミノ酸配列として少なくとも配列番号：2

で表わされるアミノ酸配列を含有し、全体として配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同意を有するアミノ酸配列などが好ましい。

【0011】本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。実質的に同質の活性としては、例えば、プロテアーゼ活性（例、プロテイナーゼ活性、ペプチダーゼ活性など）などが挙げられる。実質的に同質とは、これらの活性が性質的に（例、生理化学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。したがって、プロテアーゼ活性などの活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～10倍、より好ましくは約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。プロテアーゼ活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するスクリーニング方法に従って測定することができる。

【0012】また、本発明のタンパク質としては、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（例、1～5個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（例、1～5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。上記のようにアミノ酸配列が欠失、付加または置換されている場合、その欠失、付加または置換の位置としては、特に限定されないが、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列のうち、第179番目のA1a～第392番目のAspまでのアミノ酸配列（すなわち、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列）以外の位置などが挙げられる。

【0013】本明細書におけるタンパク質は、ペプチド表記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明のタンパク質は、C末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-CO

O⁻) であるが、C末端がアミド (-CONH₂) またはエステル (-COOR) であってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-ブロピル、イソブロピルもしくはn-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基、例えば、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル基、例えば、フェニル、α-ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基、例えば、ベンジル、フェニチルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル基もしくはα-ナフチルメチルなどのα-ナフチル-C₁₋₂アルキル基などのC₇₋₁₄アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるビパロイルオキシメチル基などが用いられる。本発明のタンパク質がC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルと同様のエステルなどが用いられる。さらに、本発明のタンパク質には、上記したタンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アシル基など)で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がビログルタミル化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば、-OH、-COOH、-SO₃Hなど)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。本発明のタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト脾臓由来のシステムプロテアーゼなどが用いられる〔図1〕。

〔0014〕本発明の部分ペプチドとしては、前記した本発明のタンパク質の部分ペプチドであって、好ましくは、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性(例、プロテアーゼ活性など)を有するものであればいずれのものでもよい。例えば、本発明のタンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、さらに好ましくは70個以上、より好ましくは100個以上、もっとも好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。本発明の部分ペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドの他、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列〔図2〕と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチドなどが用いられる。配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とは、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。ここ

で、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列は、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第179番目のA1a～第392番目のAspまでのアミノ酸配列を示す。このアミノ酸配列は、本発明のタンパク質の活性中心部位のアミノ酸配列であり、本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質の成熟体(活性体)のアミノ酸配列である。すなわち、本発明のタンパク質は、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質として発現されるが、生体内において、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第1番目～178番目のアミノ酸配列部分が切断され、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第179番目～392番目のアミノ酸配列(すなわち、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列)を有するペプチドが成熟体(活性体)としてプロテアーゼ活性等を発揮する。「実質的に同質の活性」とは、前記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は後述するスクリーニング方法に従って測定することができる。

〔0015〕また、本発明の部分ペプチドには、例えば、①配列番号：2で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個(例、1～5個))のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：2で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個(例、1～5個))のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するペプチドなども用いられる。また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基(-COOH)またはカルボキシレート(-COO⁻)であるが、前記した本発明のタンパク質のごとく、C末端がアミド(-CONH₂)またはエステル(-COOR)であってもよい。さらに、本発明の部分ペプチドには、前記の本発明のタンパク質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がビログルタミル化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。本発明の部分ペプチドは抗体作成のための抗原として用いることができるので、必ずしもプロテアーゼ活性を有する必要はない。

〔0016〕本発明のタンパク質またはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、ある

いは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、亜酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。本発明のタンパク質またはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、後述するタンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

【0017】本発明のタンパク質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩またはそれらのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質またはそれらのアミド体を取得する。上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt、HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

【0018】保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド

類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ビリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

【0019】原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロヘンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブロキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bz1、Clz-Bz1、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

【0020】原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd 黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中の接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ビペリジン、ビペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

【0021】原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。タンパク質のアミド体を得る別な方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸のα-カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端のα-アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質とを製造し、この両タンパク質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質を得ることができる。この粗タンパク質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質のアミド体を得ることができる。タンパク質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸のα-カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合アミノ酸エステルとした後、タンパク質のアミド体と同様にして、所望のタンパク質のエステル体を得ること

ができる。

【0022】本発明のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによても良い。すなわち、本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチドシンセシス (Peptide Synthesis)、Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド (The Peptide)、Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榎原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、統医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

【0023】本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、前述した本発明のタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって增幅することができる。本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：3で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：3で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と同質の活性（例、プロ

テアーゼ活性などの活性) を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

【0024】配列番号：3で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：3で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジエントな条件に従って行なうことができる。ハイストリンジエントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約1.9~4.0 mM、好ましくは約1.9~2.0 mMで、温度が約5.0~7.0 °C、好ましくは約6.0~6.5 °Cの条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約1.9 mMで温度が約6.5 °Cの場合が最も好ましい。より具体的には、配列番号：1のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：3で表わされる塩基配列を有するDNA [図3の第56番目～1231番目の塩基配列] などが用いられる。

【0025】本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、①配列番号：3で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、②配列番号：3で表わされる塩基配列とハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と同質の活性 (例、プロテアーゼ活性などの活性) を有するタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。より具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：4で表わされる塩基配列を有するDNA、または配列番号：4で表わされる塩基配列とハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と同質の活性を有する部分ペプチドをコードするDNAなどが用いられる。配列番号：4で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：4で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90

%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジエントな条件は前記と同様のものが用いられる。より具体的には、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有する本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：4で表わされる塩基配列 [図3の第590番目～1231番目の塩基配列] を有するDNAを含有するDNAなどが用いられる。

【0026】本発明のタンパク質またはその部分ペプチド (以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある) を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、(1) 本発明のタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて、PCR法によって前記DNAライブラリー等から目的とするDNAを増幅するか、または(2) 適当なベクターに組み込んだDNAと、本発明のタンパク質の一部あるいは全領域を有するDNA断片もしくは合成DNAを標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別すること、などが挙げられる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。DNAの塩基配列の変換 (欠失・置換・付加) は、公知のキット、例えば、Mutan™-G (宝酒造(株))、Mutan™-K (宝酒造(株))などを用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。クローン化された本発明のタンパク質をコードするDNAは、目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。本発明のタンパク質をコードするDNAの発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 该DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

【0027】ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド (例、pSH19, pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫病

原ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pCDNA1/Neoなどが用いられる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。これらのうち、CMVプロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPlプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、AOX1プロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドロンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

【0028】発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリア付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)などを含んでいるものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子〔メソトレキセート(MTX)耐性〕、アンビシリソ耐性遺伝子(以下、Amp'を略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子(以下、Neoと略称する場合がある、G418耐性)等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHOを用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子で形質転換された細胞をチミジンを含まない培地によっても選択できる。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、α-アミラーゼ・シグナル配列、サブカリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MFα・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、α-インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造する。

【0029】宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌の具体例としては、

エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)K12・DH1〔プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)、60巻、160(1968)〕、JM103〔ヌクレオツク・アシツ・リサーチ、(Nucleic Acids Research)、9巻、309(1981)〕、JA221〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology)〕、120巻、517(1978)〕、HB101〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー、41巻、459(1969)〕、C600〔ジエネティックス(Genetics)、39巻、440(1954)〕などが用いられる。バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス(*Bacillus subtilis*)M114〔ジーン、24巻、255(1983)〕、207-21〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(Journal of Biochemistry)、95巻、87(1984)〕などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセスセレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)AH22、AH22R、NA87-11A、DKD-5D、20B-12、シゾサッカロマイセスポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)NCYC1913、NCYC2036、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)などが用いられる。

【0030】昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞(*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞(*Bombyx mori* N cell; BmN細胞)などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞(ATCC CRL1711)、Sf21細胞(以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィトロ(in Vitro)、13、213-217(1977))などが用いられる。昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる(前田ら、ネイチャー(Nature)、315巻、592(1985))。動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO細胞と略記する)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO(dhfr-)細胞と略記する)、マウスL細胞、マウスAtT-20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞、293細胞、C127細胞、BALB3T3細胞、Sp-2細胞などが用いられる。これらの中でも、CHO細胞、CHO(dhfr-)細胞、293細胞などが好ましい。

【0031】エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)、69巻、21

10 (1972) やジーン (Gene) , 17巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なうことができる。バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics) , 168巻, 111 (1979) などに記載の方法に従って行なうことができる。酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology) , 194巻, 182-187 (1991) に記載の方法に従って行なうことができる。昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ/テクノロジー (Bio/Technology) , 6, 47-55 (1988) などに記載の方法に従って行なうことができる。動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコール, 263-267 (1995) (秀潤社発行) 、ヴィロロジー (Virology) , 52巻, 456 (1973) などに記載の方法に従って行なうことができる。発現ベクターの細胞への導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 [Graham, F. L. and van der Eb, A. J. ヴィロロジー (Virology) 52, 456-467 (1973)] 、電気穿孔法 [Neumann, E. et al. エンボ・ジャーナル (EMBO J.) 1, 841-845 (1982)] 等が挙げられる。このようにして、本発明のタンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

【0032】なお、動物細胞を用いて、本発明のタンパク質を安定に発現させる方法としては、上記の動物細胞に導入された発現ベクターが染色体に組み込まれた細胞をクローニングによって選択する方法がある。具体的には、上記の選択マーカーを指標にして形質転換体を選択する。さらに、このように選択マーカーを用いて得られた動物細胞に対して、繰り返しクローニング選択を行なうことにより本発明のタンパク質の高発現能を有する安定な動物細胞株を得ることができる。また、dhfr遺伝子を選択マーカーとして用いた場合、MTX濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、dhfr遺伝子とともに、本発明のタンパク質をコードするDNAを細胞内で増幅させて、さらに高発現の動物細胞株を得ることもできる。上記の形質転換体を本発明のタンパク質をコードするDNAが発現可能な条件下で培養し、本発明のタンパク質を生成、蓄積せしめることによって、本発明のタンパク質またはその塩を製造することができる。

【0033】宿主がエシエリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチ

ープ・リカーチ、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母抽出液、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。エシエリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics) , 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシエリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることができる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、パークホールダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 77巻, 4505 (1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 81巻, 5330 (1984)] が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0034】宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature) , 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science) , 122巻, 501 (1952)] , DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology) , 8巻, 396 (1959)] , RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・ソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)] , 199培地 [プロシージング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of

the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)]などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。特に、CHO (dhfr-) 細胞およびdhfr遺伝子を選択マーカーとして用いる場合、チミジンをほとんど含まない透析ウシ胎児血清を含むCMEM培地を用いるのが好ましい。以上のようにして、形質転換体に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

【0035】上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。本発明のタンパク質を培養菌体、昆虫あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体、昆虫あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体、昆虫あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体、昆虫あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集め。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、組換え体が產生するタンパク質に、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。かくして生成する本発明のタンパク質またはその塩の活性は、標識したりガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

【0036】本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明のタンパク質、

その部分ペプチドまたはそれらの塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明のタンパク質と略記する）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従つて製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2~6週毎に1回ずつ、計2~10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2~5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー(Nature), 256, 495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレンギリコール(PEG)やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

【0037】骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髄腫細胞があげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1:1~20:1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000~PEG6000）が10~80%程度の濃度で添加され、20~40℃、好ましくは30~37℃で1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する

方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノブテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日本製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0038】(b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法（例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法）に従って行なうことができる。

【0039】〔ポリクローナル抗体の作製〕本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテン（抗原）との混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～2.0、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュvantや不完全フロイントアジュvantを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

【0040】本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）に実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNAとしては、本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAの全塩基配列うち、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）に相補的な塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

【0041】本発明のタンパク質は、タンパク質部分の分子量が約3～6万、好ましくは約4～5万であり、活性中心部位の分子量が約2～3万のシステインプロテアーゼ（好ましくは、ヒト型システインプロテアーゼ）であり、プロ酵素の活性化、酵素の不活性化、抗原提示、ホルモン成熟化、骨吸収、組織の再構成などの生理活性を示す。以下に、本発明のタンパク質またはその塩、その部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明のタンパク質等を略記する場合がある）、本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明のタンパク質等に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）およびアンチセンスDNAの用途を説明する。

【0042】(1) 本発明のタンパク質が関与する各種疾病的治療・予防剤
システインプロテアーゼは、プロ酵素の活性化、酵素の不活性化、抗原提示、ホルモン成熟化、骨吸収、組織の再

構成などの生理活性を発揮するため、システインプロテアーゼをコードするDNAに異常があったり、欠損している場合、あるいはシステインプロテアーゼの発現量が減少している場合、例えば、糖尿病性腎症、子球体腎炎などの腎疾患、角膜疾患、肝纖維症などの肝疾患、肺纖維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛、大理石病などのシステインプロテアーゼの異常発現に関与する種々の疾病が発症する。したがって、本発明のタンパク質等およびDNAは、例えば、糖尿病性腎症、子球体腎炎などの腎疾患、肝纖維症などの肝疾患、肺纖維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛、大理石病などのシステインプロテアーゼの異常発現に関与する種々の疾病的治療・予防剤などの医薬として使用することができる。例えば、生体内においてシステインプロテアーゼが減少あるいは欠損しているために、細胞におけるプロテアーゼ活性などが十分に、あるいは正常に発揮されない患者がいる場合に、(イ) 本発明のタンパク質をコードするDNAを該患者に投与し、生体内で該タンパク質を発現させることによって、(ロ) 細胞に本発明のタンパク質をコードするDNAを挿入し、該タンパク質を発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または(ハ) 本発明のタンパク質等を該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のタンパク質の役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

【0043】本発明のDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従ってヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのままで、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。本発明のタンパク質等を上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。本発明のタンパク質等は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のタンパク質等を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例え

ば、ゼラチン、コーンスター、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスター、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

【0044】注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液(例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど)などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例えば、エタノールなど)、ポリアルコール(例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、非イオン性界面活性剤(例えば、ポリソルベート80(TM)、HCO-50など)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液などの医薬組成物は、通常、適当なアンプルに充填される。本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。本発明のタンパク質等の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、大理石病治療の目的で本発明のタンパク質等を経口投与する場合、一般的に該タンパク質等を成人(60kgとして)においては、一日につき約0.1mg~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、本発明のタンパク質等の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、椎間板ヘルニア治療の目的で本発明のタンパク質等を注射剤の形で通常成人(体重60kgとして)に投与する場合は、一日につき該タンパク質等を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度をヘルニア部分に注射することにより投与するのが好都

合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

【0045】(2) 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質等は、プロテアーゼの活性化、酵素の不活性化、抗原提示、ホルモン成熟化、骨吸収、組織の再構成などの生理活性を発揮するので、本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性を阻害する化合物またはその塩は、例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節炎などの関節炎、骨粗鬆症、腫瘍転移・浸潤、肺気腫、アルツハイマー病などの神経変成疾患、筋ジストロフィー症などの筋消耗性疾患、角膜疾患、肝纖維症などの肝疾患、肺纖維症、水疱泡症などの皮膚疾患、歯周病、天疱瘡、早産、分娩遅延などの各種疾病的治療・予防剤などの医薬として使用できる。したがって、本発明のタンパク質等は、本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。一方、本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性を促進する化合物またはその塩は、例えば、糖尿病性腎症、子球体腎炎などの腎疾患、肝纖維症などの肝疾患、肺纖維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛、大理石病などの細胞外マトリックスの蓄積を伴う疾病などの各種疾病的治療・予防剤などの医薬として使用できる。したがって、本発明のタンパク質等は、本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性を促進する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

【0046】すなわち、本発明は、

(1) 本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする本発明のタンパク質のプロテアーゼ活性を促進する化合物もしくはその塩
(以下、促進剤と略記する場合がある) または本発明のタンパク質のプロテアーゼ活性を阻害する化合物(以下、阻害剤と略記する場合がある)のスクリーニング方法を提供し、より具体的には、例えば、

(2) (i) 本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に基質を接触させた場合と (ii) 本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に基質および試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。具体的には、上記スクリーニング方法においては、例えば、(i) と (ii) の場合における、該タンパク質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩のプロテアーゼ活性(あるいは、ペプチダーゼ活性など)を測定して、比較することを特徴とするものである。

【0047】基質としては、本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の基質となり得るものであれば何れのものでもよい。例えば、カゼイン、アゾカゼイン、アゾアルブミン、アゾコラーゲン、FITC化したカゼイン、FITC化したコラーゲン、放射線標識

(例、¹⁴C、³Hなど)したカゼイン、放射線標識(例、¹⁴C、³Hなど)したコラーゲン、C末側に4-メチルーケマリン-7-アミドやP-ニトロアニリド等を結合させたオリゴペプチド類などが用いられる。試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩(以下、本発明のタンパク質等と略記する場合がある)を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより本発明のタンパク質等の標品を調製する。バッファーには、pH約4~10(望ましくは、pH約5~7)の酢酸ナトリウムバッファー、リン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどの、本発明のタンパク質等と基質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性(あるいは、ペプチダーゼ活性)は、公知のアゾカゼイン法[A. J. Barrettら、メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in ENZYMOLOGY)、80巻、535頁、1981年]に従って測定することができる。例えば、上記(ii)の場合におけるプロテアーゼ活性等が上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは約30%以上、さらに好ましくは約50%以上上昇させる試験化合物を本発明のタンパク質等の活性を促進する化合物として、一方、上記(ii)の場合におけるプロテアーゼ活性等が上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは約30%以上、さらに好ましくは約50%以上阻害する試験化合物を本発明のタンパク質等の活性を阻害する化合物として選択することができる。

【0048】本発明のスクリーニング用キットは、本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩を含有するものである。本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

〔スクリーニング用試薬〕

①測定用緩衝液

pH 5.5の酢酸ナトリウムバッファー

②タンパク質標品

40 ③基質

アゾカゼイン 10mg/ml

④反応停止液

10%トリクロロ酢酸

〔測定法〕本発明のタンパク質等に測定用緩衝液、基質を加え、混合後37℃、1時間反応させた後に、反応停止液を加え、4℃で5分間静置後、遠心した上清の366nmの吸光度を計測することによってプロテアーゼ活性を測定する。

【0049】本発明のスクリーニング方法またはスクリ

ーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などから選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性、ペプチダーゼ活性を促進または阻害する化合物である。該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。本発明のタンパク質等の活性を阻害する化合物は、例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節炎などの関節炎、骨粗鬆症、腫瘍転移・浸潤、肺気腫、アルツハイマー病などの神経変成疾患、筋ジストロフィー症などの筋消耗性疾患、角膜疾患、肝纖維症などの肝疾患、肺纖維症、水疱症などの皮膚疾患、歯周病、天疱瘡、早産、分娩遅延などの各種疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として有用である。一方、本発明のタンパク質等の活性を促進する化合物は、例えば、糖尿病性腎症、子球体腎炎などの腎疾患、肝纖維症などの肝疾患、肺纖維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛、大理石病などの細胞外マトリックスの蓄積を伴う疾患などの各種疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として有用である。

【0050】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、前述した本発明のタンパク質等を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などの製剤とすることができる。得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、慢性関節リウマチ治療の目的で本発明のタンパク質等の機能を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、慢性関節リウマチ治療の目的で本発明のタンパク質等の機能を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

【0051】(3) 本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の定量

本発明の抗体は、本発明のタンパク質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質等の定量法、および(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質等の定量法を提供する。上記(ii)の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質等のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質等のC端部に反応する抗体であることが望ましい。

【0052】また、本発明のタンパク質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質等の定量を行なえるほか、組織染色等による本発明のタンパク質等の検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')₂、Fab'、あるいはFab'画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質等の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、[¹²⁵I]、[¹³¹I]、[³H]、[¹⁴C]などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフェヌラーゼ、ペオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

【0053】抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用

いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時にあってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質等の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質等のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

【0054】本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と（F）と抗体と結合した標識抗原（B）とを分離し（B／F分離）、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B／F分離をポリエチレン glycol、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0055】これら個々の免疫学的測定法を本発明の定

量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質等の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「統ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Method 1-s))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))（以上、アカデミックプレス社発行）などを参照することができる。以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質等を感度良く定量することができる。

【0056】さらには、本発明のタンパク質抗体を用いて本発明のタンパク質等の濃度を定量することによって、本発明のタンパク質が関与する疾病的診断を行なうことができる。本発明のタンパク質等の濃度の減少が検出された場合は、例えば、糖尿病性腎症、子球体腎炎などの腎疾患、肝纖維症などの肝疾患、肺纖維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛、大理石病などの疾病である可能性が高いと診断できる。一方、本発明のタンパク質等の濃度の増加が検出された場合は、例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節炎などの関節炎、骨粗鬆症、腫瘍転移・浸潤、肺気腫、アルツハイマー病などの神経変成疾患、筋ジストロフィー症などの筋消耗性疾患、角膜疾患、肝纖維症などの肝疾患、肺纖維症、水胞泡症などの皮膚疾患、歯周病、天疱瘡、早産、分娩遅延などの疾病の可能性が高いと診断することができる。このように、本発明の抗体は、上記疾病的診断剤として有用である。また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質等を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質等の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

【0057】（4）遺伝子診断剤

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用するこ

とにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス（Genomics），第5巻，874～879頁（1989年）、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America），第86巻，2766～2770頁（1989年）などにより実施することができる。例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより該mRNAの発現低下が検出された場合は、例えば、糖尿病性腎症、子球体腎炎などの腎疾患、肝纖維症などの肝疾患、肺纖維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛、大理石病などの各種疾病等である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。一方、該mRNAの発現過多が検出された場合は、例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節炎などの関節炎、骨粗鬆症、腫瘍転移・浸潤、肺気腫、アルツハイマー病などの神経変成疾患、筋ジストロフィー症などの筋消耗性疾患、糖尿病性腎症、子球体腎炎などの腎疾患、角膜疾患、肝纖維症などの肝疾患、肺纖維症、水疱症などの皮膚疾患、歯周病、天疱瘡、早産、分娩遅延などの各種疾病等である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。また、PCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば、糖尿病性腎症、子球体腎炎などの腎疾患、肝纖維症などの肝疾患、肺纖維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛、大理石病、慢性関節リウマチ、変形性関節炎などの関節炎、骨粗鬆症、腫瘍転移・浸潤、肺気腫、アルツハイマー病などの神経変成疾患、筋ジストロフィー症などの筋消耗性疾患、糖尿病性腎症、子球体腎炎などの腎疾患、角膜疾患、水疱症などの皮膚疾患、歯周病、天疱瘡、早産、分娩遅延などの各種疾患等である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

【0058】(5) アンチセンスDNA
前記のとおり、本発明のタンパク質等は、プロ酵素の活性化、酵素の不活化、抗原提示、ホルモン成熟化、骨吸収、組織の再構成などの生理活性を發揮し、例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節炎などの関節炎、骨粗鬆症、腫瘍転移・浸潤、肺気腫、アルツハイマー病などの神経変成疾患、筋ジストロフィー症などの筋消耗性疾患、糖尿病性腎症、子球体腎炎などの腎疾患、角膜疾

患、肝纖維症などの肝疾患、肺纖維症、水疱症などの皮膚疾患、歯周病、天疱瘡、早産、分娩遅延などの各種疾患に関与している。したがって、本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができるアンチセンスDNAは、生体内における本発明のタンパク質またはDNAの機能を抑制することができる。例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節炎などの関節炎、骨粗鬆症、腫瘍転移・浸潤、肺気腫、アルツハイマー病などの神経変成疾患、筋ジストロフィー症などの筋消耗性疾患、角膜疾患、肝纖維症などの肝疾患、肺纖維症、水疱症などの皮膚疾患、歯周病、天疱瘡、早産、分娩遅延などの各種疾患の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。上記アンチセンスDNAを上記の医薬として使用する場合、前記した本発明のDNAを含有する医薬と同様にして実施することができる。

【0059】(6) 本発明のタンパク質をコードするDNAを有する非ヒト動物の作製
本発明のDNAを用いて、本発明のタンパク質等を発現するトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。非ヒト動物としては、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）（以下、動物と略記する）が挙げられるが、特に、マウス、ウサギなどが好適である。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、ウサギ由来の本発明のDNAを転移させる場合、これと相同性が高い動物由来のプロモーターであって、本発明のDNAを動物細胞で発現させうる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のタンパク質等を高産生するDNA転移動物を作出できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキタスな発現プロモーターも使用することができる。

【0060】受精卵細胞段階におけるDNAの転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するよう確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明のタンパク質等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞及び体細胞の全てに本発明のタンパク質等を有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のタンパク質等を有する。本発明のDNA転移動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、こ

の雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。本発明のDNAが転移された動物は、本発明のタンパク質等が高発現させられているので、本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用の動物などとして有用である。本発明のDNA転移動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明のDNA転移マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するかあるいは遺伝子により発現された本発明のタンパク質等が存在する組織を分析することにより、本発明のタンパク質等について分析することができる。本発明のタンパク質等を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のようないくつかの一般的に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明のタンパク質等を単離精製することも可能である。

【0061】本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャー・リボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸

Tos	: p-トルエンスルフォニル
CHO	: ホルミル
BzI	: ベンジル
Cl ₂ BzI	: 2, 6-ジクロロベンジル
Bom	: ベンジルオキシメチル
Z	: ベンジルオキシカルボニル
C1-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
Br-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
BoC	: t-ブトキシカルボニル
DNP	: ジニトロフェニル
Trt	: トリチル
Bum	: t-ブトキシメチル
Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
HOBt	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール

dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム

【0062】

Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸
Lys	: リジン
Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニルアラニン
Tyr	: チロシン
Trp	: ドリフトファン
Pro	: プロリン
Asn	: アスパラギン
Gln	: グルタミン
pGlu	: ピログルタミン酸
Me	: メチル基
Et	: エチル基
Bu	: ブチル基
Ph	: フェニル基
TC	: チアゾリジン-4(R)-カルボキ
	: サミド基

【0063】また、本明細書中で頻用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

HOOB t	: 3-ヒドロキシ-3,4-ジヒドロ-4-オキゾ-1,2,3-ベンゾトリアジン
HONB	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシミド
DCC	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

【0064】本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕本発明のヒト脾臓由来システインプロテアーゼのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕本発明のヒト脾臓由来システインプロテアーゼの部分ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：3〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヒト脾臓由来システインプロテアーゼをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト脾臓由来システインプロテアーゼの部分ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕本発明のタンパク質をコードするDNAのクローニングに使用した合成プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕本発明のタンパク質をコードするDNAのクローニングに使用した合成プライマーの塩基配列を示す。

【0065】後述の実施例1で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (Escherichia coli) DH10B/pT B1920は、平成8年4月22日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号 FERM BP-5515として、平成8年4月19日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号 IFO 15949として寄託されている。

【0066】

【実施例】以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

【0067】

【実施例1】ヒト脾臓由来システインプロテアーゼをコードする遺伝子のクローニング
cDNAのクローニングは、ジーントラッパー・ポジティブ選択システム (ギブコピーアールエル社) を用いて行った。ヒト脾臓由来のcDNAライブラリー (ギブコピーアールエル社) の大腸菌DH12S株をTerrific Broth (1.2 g/l bacto-tryptone (ディフコ社), 2.4 g/l bacto-yeast extract (ディフコ社), 2.3 g/l リン酸一カリウム, 1.25 g/l リン酸二カリウム) で30℃で16時間培養し、キアジェンプラスミドキット (キアジェン社) を用いて、プラスミドcDNAライブラリーを精製抽出した。精製したプラスミドcDNAライブラリーをGene II, Exo III (いずれもギブコピーアールエル社) によって消化し、一本鎖cD

NAライブラリーを作成した。一方、プローブとして、合成オリゴヌクレオチド (配列番号：5) をcDNAライブラリーのスクリーニングに用いた。プローブは、Td T, ピオチン-14-dCTP (ギブコピーアールエル社) を用いて、3'末端をピオチン化することで標識した。一本鎖cDNAライブラリーを95℃で1分間処理した後、氷中で急冷し、ピオチン化したプローブを加えて37℃で1時間、室温でハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、ジーントラッパー・ポジティブ選択システム・マグネットビーズ (ギブコピーアールエル社) を加えて、室温で2分ごとに搅拌しながら30分間放置した。その後、ジーントラッパー・ポジティブ選択システム・マグネットラック (ギブコピーアールエル社) 中に入れ、2分間放置した。上清を捨て、マグネットビーズをジーントラッパー・ポジティブ選択システム・ウォッシュバッファーで洗浄した。このウォッシュバッファーによる洗浄を3回行った。その後、マグネットラックに入れて放置し、上清を捨て、ジーントラッパー・ポジティブ選択システム・溶出バッファーを加え、5分間室温で放置した。マグネットラックに入れて5分間放置した後、その上清のDNA溶液を回収した。
【0068】取得したDNA溶液にプライマーとして合成オリゴヌクレオチド (配列番号：5) を入れ、95℃で1分間放置した。ジーントラッパー・ポジティブ選択システム・修復酵素を加え、70℃で15分間放置して二本鎖DNAを合成した。合成した二本鎖DNAをエレクトロポレーション装置 (バイオ・ラッド社) により、大腸菌DH10B株に導入した。得られた形質転換株を用いて2本のオリゴヌクレオチド (配列番号：5、配列番号：6) をプライマーとしてコロニーPCRによるスクリーニングを行った。PCRにより108bpの増幅断片が形成されたコロニーを陽性クローランとして2株選択した。選択した大腸菌を培養後、DNAを抽出し、Taq ダイテオキシターミネーターサイクルシーケンシングキット (パーキンエルマー社) を用いて反応を行い、340 77 DNAシーケンサー (パーキンエルマー社) により、cDNA断片の塩基配列を決定した。取得したクローランは、poly(A)・鎖および配列番号：3で表わされる1176個の塩基配列を含有する1740個の塩基配列を有していた。このcDNA断片には、配列番号：1で表される392個のアミノ酸からなる新規システインプロテアーゼがコードされており、活性中心であるシステイン、ヒスチジン、アスパラギン残基も保存されていた。また、ヒト由来カテプシンLとのアミノ酸レベルでの相同性は40%、マンソン住血吸虫由来システインプロテアーゼとのアミノ酸レベルでの相同性は49%しか

なかった。本発明のヒト脾臓由来システィンプロテアーゼをコードするDNAを保持するプラスミドpTB1920を大腸菌(Escherichia coli)DH10Bに導入して、形質転換体：大腸菌(Escherichia coli)DH10B/pTB1920を得た。

【0069】

【実施例2】本発明のヒト脾臓由来システィンプロテアーゼの一過性発現と細胞抽出液の調製

実施例1で得たpTB1920はすでに発現プラスミドpCMV・SPORT(ギブコピーアールエル社)に組み込まれており、動物細胞における発現に用いられる。COS-7細胞(財団法人発酵研究所より購入)を血清含有DMEM培地で培養し、遺伝子導入の前日に継代し50%コンフルエントとなったCOS-7細胞を血清不含DMEM培地で洗浄後、2.5mlの無血清培地を添加し、そこに5μgのpTB1920を含むTRANSFECTAM(ニッポンジーン社)混合液を加えた。37℃、5%CO₂の条件で4時間培養した後、20%牛血清含有DMEM培地を加え、さらに20時間培養した。血清不含DMEM培地に交換し、3日後に細胞を回収した。細胞はGuo-Ping Shiらの方法(ジャーナル・バイオロジカル・ケミストリー、267巻、7258-7262頁、1992年)に従って、lysisbuffer(4.0mM酢酸ナトリウム、1mM EDTA、1% Triton X-100、pH 5.5)に懸濁し、37℃で1時間静置後、遠心(1,500 rpm, 10分)し、新規システィンプロテアーゼを含む細胞抽出液を得た。また、TRANSFECTAM溶液のみを加え同様の処理を行なった細胞抽出液をコントロールとして用いた。

【0070】

【実施例3】ヒト脾臓由来システィンプロテアーゼによるアゾカゼインの分解

実施例2で得た0.05mlの細胞抽出液を0.15mlの酵素反応液(終濃度5mg/mlアゾカゼイン(シグマ社製)、100mM酢酸ナトリウム、1mM EDTA、2mM DTT、pH 5.5)に混合し、37℃、1時間反応させた。0.2mlの10%トリクロロ酢酸溶液を加え、4℃で5分静置後、遠心し(1,000 rpm, 10分)、得られた上清の366nmの吸光度を測定した。コントロールのmockの細胞抽出液にくらべ、新規システィンプロテアーゼを含む細胞抽出液を用いた場合、吸光度が0.1上昇した。このことから、実施例2で得た細胞抽出液に含まれるヒト脾臓由来システィンプロテアーゼが、アゾカゼインを分解することが分かった。

【0071】

【実施例4】阻害剤探索系の設定

96穴プレート(フルオロBプレート、大日本製薬製)に実施例2で得られた細胞破碎液10μLと0.1%Brij35(シグマ社)1.5μLおよび50μLの緩衝液(0.2M酢酸ナトリウム(pH 5.5), 4mM 1,

4-ジチオスレイトール, 2.5mMエチレジジアミンテトラ酢酸, 0.05%トリトンX-100)を加え、37℃にて5分間ブレインキュベーションした後、20μMの基質[Z-Leu-Arg-MCA]を2.5μL添加することによって酵素反応を開始した。37℃にて10分反応後、マイクロプレートリーダー(MTP-32、CORONA ELECTRONIC製)を用いて、励起波長365nm、吸収波長460nmで反応液中の蛍光強度を測定した。細胞破碎液無添加の場合の蛍光強度(86)に対し、細胞破碎液を添加した場合は、1520の蛍光強度を示した。この反応にシスティンプロテアーゼ阻害剤であるE-64(ペプチド研究所)を各種濃度添加することによりプロテアーゼ活性が阻害され、E-64は約25nMでこの酵素反応を50%阻害した。このことから、本アッセイ系を用いて、システィンプロテアーゼ阻害剤の探索が可能であることを確認した。

【0072】

【実施例5】抗システィンプロテアーゼポリクローナル抗体の取得

実施例1でpTB1920を得た際に同時に得られたシスティンプロテアーゼ遺伝子の82番目のグアニンから以降を含むプラスミドを制限酵素SalI, NotIで切断し、その挿入部分を同様に処理したpGEX4T-3(ファルマシア)にライゲーションした。このライゲーション液を用いて大腸菌JM109(宝酒造(株))を形質転換し、大腸菌(Escherichia coli)JM109/pGEX4T-3/Cysを得た。次に、この大腸菌を用いて、本発明の組換え型ヒト脾臓由来システィンプロテアーゼを取得した。大腸菌での発現・精製は、Bulk and ReadyPack GST Purification Modules(ファルマシア)添付のプロトコールに準じて行なった。その結果、目的のグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質は、1Lの大腸菌培養液から1.8mg取得できた。得られた組換え型ヒト脾臓由来システィンプロテアーゼ(200μg)を完全フロントアジュvantに懸濁し、日本白色ウサギに初回免疫を行なった。以後、2週間毎4回、400μgの組換え型ヒト脾臓由来システィンプロテアーゼを不完全フロントアジュvantに懸濁後免疫した。最終免疫の1週後に全採血することにより、約50mlの血清が取得できた。抗体価の測定は以下のように行なった。組換え型ヒト脾臓由来システィンプロテアーゼを0.5μg/ウェルとなるように固定化した後、BSAでブロッキングした96穴プレートに、希釈したウサギ血清を添加し、室温で2時間静置した。0.1%Tween-20を含むPBSで洗浄後、抗ウサギIgG-バーオキシダーゼ(Capel製)を加え2時間静置した。洗浄後、o-フェニレンジアミンと過酸化水素を含むクエン酸-リン酸緩衝液を加え、20分間発色させた。反応を1M硫酸で停止させた後、プレートリーダーを用いて492nmの発色を測定した。その結

果、非免疫ウサギの約1万倍の抗体価を示す抗血清が得られた。

[0073]

【発明の効果】本発明のタンパク質等またはDNAは、例えば、糖尿病性腎症、子球体腎炎などの腎疾患、肝繩維症などの肝疾患、肺繩維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛、大理石病などの種々の疾病的治療・予防剤として使用することができる。また、本発明のタンパク質等は、本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性を促進もしくは阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用試薬として有用である。さらに、本発明の

配列

Met	Val	Cys	Arg	Leu	Pro	Val	Ser	Lys	Lys	Thr	Leu	Leu	Cys	Ser	Ph
1						5				10					15
Gln	Val	Leu	Asp	Glu	Leu	Gly	Arg	His	Val	Leu	Leu	Arg	Lys	Asp	Cys
						20				25					30
Gly	Pro	Val	Asp	Thr	Lys	Val	Pro	Gly	Ala	Gly	Glu	Pro	Lys	Ser	Ala
						35				40					45
Phe	Thr	Gln	Gly	Ser	Ala	Met	Ile	Ser	Ser	Leu	Ser	Gln	Asn	His	Pro
						50				55					60
Asp	Asn	Arg	Asn	Glu	Thr	Phe	Ser	Ser	Val	Ile	Ser	Leu	Leu	Asn	Glu
						65				70					80
Asp	Pro	Leu	Ser	Gln	Asp	Leu	Pro	Val	Lys	Met	Ala	Ser	Ile	Phe	Lys
						85				90					95
Asn	Phe	Val	Ile	Thr	Tyr	Asn	Arg	Thr	Tyr	Glu	Ser	Lys	Glu	Glu	Ala
						100				105					110
Arg	Trp	Arg	Leu	Ser	Val	Phe	Val	Asn	Asn	Met	Val	Arg	Ala	Gln	Lys
						115				120					125
Ile	Gln	Ala	Leu	Asp	Arg	Gly	Thr	Ala	Gln	Tyr	Gly	Val	Thr	Lys	Phe
						130				135					140
Ser	Asp	Leu	Thr	Glu	Glu	Glu	Phe	Arg	Thr	Ile	Tyr	Leu	Asn	Thr	Leu
						145				150					160
Leu	Arg	Lys	Glu	Pro	Gly	Asn	Lys	Met	Lys	Gln	Ala	Lys	Ser	Val	Gly
						165				170					175
Asp	Leu	Ala	Pro	Pro	Glu	Trp	Asp	Trp	Arg	Ser	Lys	Gly	Ala	Val	Thr
						180				185					190
Lys	Val	Lys	Asp	Gln	Gly	Met	Cys	Gly	Ser	Cys	Trp	Ala	Phe	Ser	Val
						195				200					205
Thr	Gly	Asn	Val	Glu	Gly	Gln	Trp	Phe	Leu	Asn	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu
						210				215					220
Ser	Leu	Ser	Glu	Gln	Glu	Leu	Leu	Asp	Cys	Asp	Lys	Met	Asp	Lys	Ala
						225				230					240
Cys	Met	Gly	Gly	Leu	Pro	Ser	Asn	Ala	Tyr	Ser	Ala	Ile	Lys	Asn	Leu
						245				250					255
Gly	Gly	Leu	Glu	Thr	Glu	Asp	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Gln	Gly	His	Met	Gln
						260				265					270
Ser	Cys	Asn	Phe	Ser	Ala	Glu	Lys	Ala	Lys	Val	Tyr	Ile	Asn	Asp	Ser
						275				280					285
Val	Glu	Leu	Ser	Gln	Asn	Glu	Gln	Lys	Leu	Ala	Ala	Trp	Leu	Ala	Lys
						290				295					300

タンパク質等に対する抗体は、本発明のタンパク質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質等の定量などに使用することができる。

[0074]

【配列表】

【配列番号：1】

配列の長さ : 392

配列の型：アミノ酸

10 配列の種類：タンパク

41

Arg Gly Pro Ile Ser Val Ala Ile Asn Ala Phe Gly Met Gln Phe Tyr
 305 310 315 320
 Arg His Gly Ile Ser Arg Pro Leu Arg Pro Leu Cys Ser Pro Trp Leu
 325 330 335
 Ile Asp His Ala Val Leu Leu Val Gly Tyr Gly Asn Arg Ser Asp Val.
 340 345 350
 Pro Phe Trp Ala Ile Lys Asn Ser Trp Gly Thr Asp Trp Gly Glu Lys
 355 360 365
 Gly Tyr Tyr Tyr Leu His Arg Gly Ser Gly Ala Cys Gly Val Asn Thr
 370 375 380
 Met Ala Ser Ser Ala Val Val Asp
 385 390

【0075】

【配列番号：2】

配列の長さ：214

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ala Pro Pro Glu Trp Asp Trp Arg Ser Lys Gly Ala Val Thr Lys Val
 1 5 10 15
 Lys Asp Gln Gly Met Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Val Thr Gly
 20 25 30
 Asn Val Glu Gly Gln Trp Phe Leu Asn Gln Gly Thr Leu Leu Ser Leu
 35 40 45
 Ser Glu Gln Glu Leu Leu Asp Cys Asp Lys Met Asp Lys Ala Cys Met
 50 55 60
 Gly Gly Leu Pro Ser Asn Ala Tyr Ser Ala Ile Lys Asn Leu Gly Gly
 65 70 75 80
 Leu Glu Thr Glu Asp Asp Tyr Ser Tyr Gln Gly His Met Gln Ser Cys
 85 90 95
 Asn Phe Ser Ala Glu Lys Ala Lys Val Tyr Ile Asn Asp Ser Val Glu
 100 105 110
 Leu Ser Gln Asn Glu Gln Lys Leu Ala Ala Trp Leu Ala Lys Arg Gly
 115 120 125
 Pro Ile Ser Val Ala Ile Asn Ala Phe Gly Met Gln Phe Tyr Arg His
 130 135 140
 Gly Ile Ser Arg Pro Leu Arg Pro Leu Cys Ser Pro Trp Leu Ile Asp
 145 150 155 160
 His Ala Val Leu Leu Val Gly Tyr Gly Asn Arg Ser Asp Val Pro Phe
 165 170 175
 Trp Ala Ile Lys Asn Ser Trp Gly Thr Asp Trp Gly Glu Lys Gly Tyr
 180 185 190
 Tyr Tyr Leu His Arg Gly Ser Gly Ala Cys Gly Val Asn Thr Met Ala
 195 200 205
 Ser Ser Ala Val Val Asp
 210

【0076】

【配列番号：3】

配列の長さ：1176

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

ATCGTGTGCC GGCTCCCCGT GTCCAAGAAA ACCCTGCTCT GCAGCTTCCA AGTCCTGGAT 60

GAGCTCGGAA GACACGTGCT GCTGCCGAAG GACTGTGCC CAGTGGACAC CAAGGTTCCA	120
GGTGTGGGG AGCCCAAGTC AGCCTTCACT CAGGGCTAG CCATGATTC TTCTCTGTCC	180
CAAAACCATC CAGACAAACAG AAACGAGACT TTCAGCTAG TCATTCCTT GTGAATGAG	240
GATCCCCGTG CCCAGGACT GCCTGTGAAG ATGGCTTCAA TCTTCAAGAA CTTTGTATT	300
ACCTATAACC GGACATATGA CTCAAAGGAA GAAGCCCGGT GGCGCTGTC CGTCTTGTG	360
AATAACATGG TCCGAGCACA GAAGATCCAG GCCCTGGACC GTGGCACAGC TCAGTATGGA	420
GTCACCAAGT TCAGTGTACT CACAGAGGAG GAGTCCGCA CTATCTACCT GAATACTCTC	480
CTGAGGAAAG AGCCTGGAA CAAGATGAAG CAAGCCAAGT CTGTTGGTGA CCTCGCCCCA	540
CCTGAATGGG ACTGGAGGAG TAAGGGGCT GTCAAAAAG TCAAAGACCA GGGCATGTGT	600
GGCTCTGCT GGGCTTCTC AGTCACAGGC ATGTCAGGAG GCCAGTGGTT TCTCAACCAG	660
GGGACCTGTC TCTCCCTCTC TGAACAGGAG CTCTTGGACT GTGACAAGAT GGACAAGGCC	720
TGCATGGCG GCTTGCCTC CAATGCCTAC TCGGCCATAA AGAATTTGGG AGGGCTGGAG	780
ACAGAGGATG ACTACACCTA CCAGGGTCAC ATGCACTCCT GCAACTCTC AGCAGAGAAG	840
GCCAAGGTCT ACATCAATGA CTCCGTGGAG CTGACCCAGA ACAGACAGAA GCTGGCACCC	900
TGGCTGCCA AGAGAGGCC AATCTCCGTG CCCATCAATG CCTTTGGCAT GCAGTTTAC	960
CGCCACGGGA TCTCCGCCCT TCTCCGGCCC CTCTGCAGCC CTTGGCTCAT TGACCATGCG	1020
GTGTTGCTTG TGGCTACGG CAACCGCTCT GACGTTCCCT TTTGGCCAT CAAGAACAGC	1080
TGGGCCACTG ACTGGGGTGA GAAGGGTTAC TACTACTTGC ATCGTGGTC CGGGCCCTGT	1140
GGCGTGAACA CCATGGCCAG CTGGCGGTG GTGGAC	1176

【0077】

【配列番号：4】

配列の長さ：642

配列の型：核酸

20 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

GCCCCACCTG AATGGGACTG GAGGAGTAAG GGG	
GCTGTCA CAAAAGTCAA AGACCCAGGGC	60
ATGTGTGGCT CCTGCTGGC CTTCTCAGTC ACA	
GGCAATG TGGAGGGCCA GTGGTTTCTC	120
AACCAGGGGA CCCTGCTCTC CCTCTCTGAA CAG	
GAGCTCT TGGACTGTGA CAAGATGGAC	180
AAGGCCCTGCA TGGGGGGCTT GCCCTCCAAT GCC	
TACTCGG CCATAAAAGAA TTTGGGAGGG	240
CTGGAGACAG AGGATGACTA CAGCTACCAAG GGT	
CACATGC AGTCCTGCAA CTTCTCAGCA	300
GAGAAGGCCA AGGTCTACAT CAATGACTCC GTG	
GAGCTGA GCCAGAACGA GCAGAACAGT	360
GCAGCCTGGC TGGCCAAGAG AGGCCCAATC TCC	
GTGGCCA TCAATGCCTT TGGCATGCAG	420
TTTTACCGCC ACAGGGATCTC CCGCCCTCTC CGG	
CCCCTCT GCAGCCCTTG GCTCATTGAC	480
CATGCGGTGT TGCTTGTGGG CTACGGCAAC CGC	
TCTGACG TTCCCTTTG GGCCATCAAG	540
AACAGCTGGG GCACTGACTG GGGTGAGAAG GGT	
TACTACT ACTTGCATCG TGGGTCCGGG	600
GCCTGTGGCG TGAACACCAT GGCCAGCTCG GCG	
GTGGTGG AC	642

【0078】

【配列番号：5】

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

GGACCGTGGC ACAGCTCAGT ATG
23

【0079】

【配列番号：6】

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TTGTTGCCAG GCTCTTTCT CAGG 24

【0080】

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のヒト脾臓由来システインプロテアーゼ（プロ領域+成熟体）のアミノ酸配列を示す。

【図2】本発明のヒト脾臓由来システインプロテアーゼの活性部位（成熟体）のアミノ酸配列を示す。

【図3】本発明のヒト脾臓由来システインプロテアーゼをコードするDNAを含むDNAの塩基配列を示す。

【図1】

Met Val Cys Arg Leu Pro Val Ser Lys Lys Thr Leu Leu Cys Ser Phe Gln Val Leu Asp	20
Glu Leu Gly Arg His Val Leu Leu Arg Lys Asp Cys Gly Pro Val Asp Thr Lys Val Pro	40
Gly Ala Gly Glu Pro Lys Ser Ala Phe Thr Gln Gly Ser Ala Met Ile Ser Ser Leu Ser	60
Gln Asn His Pro Asp Asn Arg Asn Glu Thr Phe Ser Ser Val Ile Ser Leu Leu Asn Glu	80
Asp Pro Leu Ser Gln Asp Leu Pro Val Lys Met Ala Ser Ile Phe Lys Asn Phe Val Ile	100
Thr Tyr Asn Arg Thr Tyr Glu Ser Lys Glu Glu Ala Arg Trp Arg Leu Ser Val Phe Val	120
Asn Asn Met Val Arg Ala Gln Lys Ile Gln Ala Leu Asp Arg Gly Thr Ala Gln Tyr Gly	140
Val Thr Lys Phe Ser Asp Leu Thr Glu Glu Phe Arg Thr Ile Tyr Leu Asn Thr Leu	160
Leu Arg Lys Glu Pro Gly Asn Lys Met Lys Gln Ala Lys Ser Val Gly Asp Leu Ala Pro	180
Pro Glu Trp Asp Trp Arg Ser Lys Gly Ala Val Thr Lys Val Lys Asp Gln Gly Met Cys	200
Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Val Thr Gly Asn Val Glu Gly Gln Trp Phe Leu Asn Gln	220
Gly Thr Leu Leu Ser Leu Ser Glu Gln Glu Leu Leu Asp Cys Asp Lys Met Asp Lys Ala	240
Cys Met Gly Gly Leu Pro Ser Asn Ala Tyr Ser Ala Ile Lys Asn Leu Gly Gly Leu Glu	260
Thr Glu Asp Asp Tyr Ser Tyr Gln Gly His Met Gln Ser Cys Asn Phe Ser Ala Glu Lys	280
Ala Lys Val Tyr Ile Asn Asp Ser Val Glu Leu Ser Gln Asn Glu Gln Lys Leu Ala Ala	300
Trp Leu Ala Lys Arg Gly Pro Ile Ser Val Ala Ile Asn Ala Phe Gly Met Gln Phe Tyr	320
Arg His Gly Ile Ser Arg Pro Leu Arg Pro Leu Cys Ser Pro Trp Leu Ile Asp His Ala	340
Val Leu Leu Val Gly Tyr Gly Asn Arg Ser Asp Val Pro Phe Trp Ala Ile Lys Asn Ser	360
Trp Gly Thr Asp Trp Gly Glu Lys Gly Tyr Tyr Leu His Arg Gly Ser Gly Ala Cys	380
Gly Val Asn Thr Met Ala Ser Ser Ala Val Val Asp	392

【図2】

Ala Pro Pro Glu Trp Asp Trp Arg Ser Lys Gly Ala Val Thr Lys Val Lys Asp Gln Gly	20
Met Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Val Thr Gly Asn Val Glu Gly Gln Trp Phe Leu	40
Asn Gln Gly Thr Leu Leu Ser Leu Ser Glu Gln Glu Leu Leu Asp Cys Asp Lys Met Asp	60
Lys Ala Cys Met Gly Gly Leu Pro Ser Asn Ala Tyr Ser Ala Ile Lys Asn Leu Gly Gly	80
Leu Glu Thr Glu Asp Asp Tyr Ser Tyr Gln Gly His Met Gln Ser Cys Asn Phe Ser Ala	100
Glu Lys Ala Lys Val Tyr Ile Asn Asp Ser Val Glu Leu Ser Gln Asn Glu Gln Lys Leu	120
Ala Ala Trp Leu Ala Lys Arg Gly Pro Ile Ser Val Ala Ile Asn Ala Phe Gly Met Gln	140
Phe Tyr Arg His Gly Ile Ser Arg Pro Leu Arg Pro Leu Cys Ser Pro Trp Leu Ile Asp	160
His Ala Val Leu Leu Val Gly Tyr Gly Asn Arg Ser Asp Val Pro Phe Trp Ala Ile Lys	180
Asn Ser Trp Gly Thr Asp Trp Gly Glu Lys Gly Tyr Tyr Leu His Arg Gly Ser Gly	200
Ala Cys Gly Val Asn Thr Met Ala Ser Ser Ala Val Val Asp	214

[図3]

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 CGGACCGTGGCGGACCGTGGCGGACCGTGGCGGACCGTGGCGGACCCATGGTGTGGCGTCCCCGTGTCANGAAAACCCGTGCTCTCGAC
 H V C R L P V S K K T L L C S

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TCCCAAGTCTGGATGAGCTCGGAAGACACCTGGCTGGCGGACGGACTCTGGCCCAAGTGGACACCAAGCTTACGGTGTGCGGAGGCCAAGTCAGCGT
 F Q V L D E L G R H V L L R K D C G P V D T K V P G A G E P K S A F

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 TCACTCAGGCGTCAGCCATGATTCCTCTGTCCTCAAAACCATCCAGAACAGAACAGGAGACTTTCAGCTCAGTCATTTCCCTGTGAAATGAGGATCC
 T Q O S A M I S S L S Q N H P D N R N E T F S S V I S L L N E D P

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 CCTGTCGCCAGGACTTGTGAGAGATGGCTCAATCTTCAGAACACTTGTCTTACCTATAACCGGACATATGAGTCAAAGGAAGAAGCCCGTGGCGC
 L S Q D L P V K H A S I F K N F V I T Y N R T Y E S K E E A R W R

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 CTGTCCTGCTTGTGAAATAACATGGTGAGCAGAACAGGCTGGCGGACCTGGACAGTCAGTGGAGCTACCAAGTCAGTCATCTCACAG
 L S V F V N M V R A Q X I Q A L D R G T A Q Y G V T K F S D L T E

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 AGGAGGAGTCCGCACTATCTACCTGAATACTCTCTGAGGAAGAGCCCTGGCAACAGATGAGCAAGCCAGTCAGTCAGTCACGGCAATGTGGAGGCCAG
 E E F R T I T L N T L L R K E P G N K M K Q A K S V G D L A P P E

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 ATGGGACTGGAGGAGTAAGGGGGCTGTCAACAAAAGTCAAAGACCGGGCATGTGTGCGCTCTGCGGCCCTTCAGTCAGTCAGGCAATGTGGAGGCCAG
 W D W R S X G A V T K V K D Q C M C G S C H A P S V T C N V E G Q

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 TCGGTTCTACCAAGGGCACCTGCTCTCTGAGGAGCTCTGGACTGAGCATGGGCTGCACTGGGGCTTCCCTCCAAATG
 W F L H Q G T L L S L S E Q E L L D C D K M D K A C H G Q L P S N A

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 CCTACTCGGCCATAAGAAATTGGAGGCTGGAGACAGAGGATGACTACAGCTTACCGGGTACATGGAGTCCTGCAACTTCTCAGCAGAGAAAGCCAA
 Y S A I K N L G G L E T E D D Y S Y Q G H M Q S C N P S A E K A K

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 CCTCTACATCAATGACTCCGTGGAGCTGGCCACAACGGAGCAGAACAGGCTGGCGCTGGCTGGCGCAAGAGGGCCAAATCTCCGTGGCCATCAATCCCTT
 V Y I N D S V E L S O N E Q K L A A W L A K R G P I S V A I N A F

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 GGCATGCGACTTACCGGGATCTCCGGCCCTCTCGGCCCCCTCTCGAGCGCTGGCTGACATGGACCTGGGCTGCGCTGCGCTACCGCGAAC
 G H O F Y R H G I S R P L R P L C S P W L I D H A V L L V G Y G N R

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 CCTCTGAGCTTCCCTTTGGCCATCAGAACAGCTGGGACTGACTGGGTGAGAACGGTTACTACTACTTGCACTGTTGGGTCGGGGCTGTGGCGT
 S D V P F W A I K H S W G T D W G B K G Y Y Y L H R G S G A C G V

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
 GAACACCATGGCCAGCTGGCGGTGGACTGAGACGGGGCCCCCAOCTGGGACCTGGTGTGATCAGACTGGCTGGCCCCAGGCTGACATGTGTC
 N T H A S S A V V D *

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 CAGGGCCCTCCGGGAGGTACAGCTGGCAGAGGGAAAGGCACTGGGTACCTCAGGGTGAGCAGAGGGCACTGGGCTGGGCAAGGCCCCGTGCTCCCTG

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 CACCCCATCCACCGTGAAGTCTGCACCTTGTGAATTGTGTAGCTTGGAGGATGTCGGGTGAAGGGTGGTATCTGGCAGTTGAAC

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
 TGGGGCAAGAACCTCTGGCTTGGGATAGTGTGCTCTCCATGTCAGGAAAACCTGTAACCCCTTCTAACAGGAAATAAGGGTGTCTCTGTC

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
 AATTTCTGGTCTCCCTGGATTTAGGGATAGTGTGCTCTCCATGTCAGGAAAACCTGTAACCCCTTCTAACAGGAAATAAGGGTGTCTCTGTC

1710 1720 1730 1740 1749
 CCCAAAAA

フロントページの続き

(51) Int.C1. ⁶	識別記号	F I
A 6 1 K 48/00	A B J	A 6 1 K 48/00
	A B L	A B L
	A C D	A C D
	A C K	A C K
	A C S	A C S
	A C V	A C V

ACV		ADA
ADA		ADP
ADP		ADT
ADT		ADU
ADU		AED
AED		
C 0 7 H 21/04	C 0 7 H 21/04	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
5/10	9/50	
9/50	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	33/577	B
33/577	A 6 1 K 37/54	
//(C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 R 1:91)		
(C 1 2 N 1/21		
C 1 2 R 1:19)		
(C 1 2 N 9/50		
C 1 2 R 1:19)		
(C 1 2 N 9/50		
C 1 2 R 1:91)		
(C 1 2 P 21/08		
C 1 2 R 1:91)		